OsIMA1 增强水稻对镉逆境的适应性

彭凤[1,2]，路承凯[1,2]，梁岗[1,2*]

(1. 中国科学院西双版纳热带植物园热带植物资源可持续利用重点实验室，昆明 650223；

2. 中国科学院大学 生命科学院，北京 100049)

摘要：铁（Fe）是植物生长发育所必需的营养元素而镉（Cd）是对植物有害的元素，且植物对 Fe 和 Cd 的吸收存在拮抗作用。OsIMA 是一类正调控水稻 Fe 吸收的一类小肽，其过表达可以促进 Fe 的积累。为探究 OsIMA 是否参与水稻对 Cd 胁迫的适应性，该研究以水稻为研究材料，利用荧光定量 PCR 分析了 *OsIMA* 基因的表达水平，通过遗传转化和 CRISPR/Cas9 基因编辑技术构建了 *OsIMA1* 过表达植物和 *ima1* 突变体植物，评估了 *OsIMA1* 过表达和突变体植物在 Cd 逆境条件下的株高，并用利用电联耦合等离子体质谱法测量了根和地上部的 Fe 和 Cd 含量。结果表明：（1）Cd 处理后，*OsIMA1* 和 *OsIMA2* 的转录水平上调。（2）*OsIMA1* 过表达植物比野生型植物对 Cd 胁迫更耐受。（3）*ima1* 功能缺失突变体比野生型植物对 Cd 胁迫更敏感。（4）Cd 含量检测发现，*OsIMA1* 过表达植株根系的 Cd 含量较高，而 *ima1* 突变体植株地上部的 Cd 含量较高。综上所述，OsIMA1 通过限制 Cd 从根向地上部的转运以增强水稻对 Cd 逆境的适应能力，该研究为定向培育耐 Cd 作物提供了理论依据。

关键词：水稻，*OsIMA*，Cd，Fe，拮抗作用

中图分类号：Q945　　**文献标识码：**A　　文章编号：

OsIMA1 enhances tolerance to cadmium stress in rice

PENG Feng[1,2] , LU Cheng Kai[1,2] , LIANG Gang[1,2*]

(1. *CAS Key Laboratory of Tropical Plant Resources and Sustainable Use*, *Xishuangbanna Tropical Botanical Garden*, *Chinese Academy of Sciences*, Kunming, 650223, China; 2. *College of*

基金项目：云南省科技厅科技计划项目（202003AD150007）[Supported by.the Science and Technology Project of Yunnan Province]。

第一作者：彭凤(1996 年-)，硕士研究生，主要从事植物铁营养代谢研究，(E-mail) 1272277231@qq.com;

***通信作者：**梁岗，博士，研究员，主要从事植物矿质营养研究，(E-mail) lianggang@xtbg.ac.cn。

Life Sciences, *University of Chinese Academy of Sciences*, Beijing 100049, China)

Abstract: Iron (Fe) is crucial for the growth and development of plants and cadmium (Cd) is toxic to plants. There is an antagonistical mechanism between Fe and Cd uptake in plants. OsIMAs are a class of small peptides, and their overexpression improves Fe accumulation in rice. To explore the role of *OsIMA* genes in response to Cd stress, we analyzed the expression of two *OsIMA* genes by qRT-PCR, generated *OsIMA1* overexpression plants and CRISPR/Cas9 edited *ima1* mutants by genetic transformation, assessed the phenotypes of *OsIMA1* overexpressing plants and *ima1* loss-of-function mutant plants under Cd stress, and measured the Fe and Cd concentration of root and shoot. The results were as follows: (1) Both *OsIMA1* and *OsIMA2* were induced by Cd treatment. (2) Overexpression of *OsIMA1* gene improved the tolerance of plants to Cd stress. (3) The loss-of-function of *OsIMA1* led to the higher sensitivity of plants to Cd stress. (4) Measurement of Cd concentration indicated that *OsIMA1* overexpressing plants accumulated more Cd in the root and the *ima1* mutants accumulated more Cd in the shoot. Taken together, these data suggest that *OsIMA1* improves Cd tolerance by restricting Cd translocation from root to shoot, which provides the theoretical base for breeding the Cd-tolerant rice.

Key words: rice, *OsIMA*, cadmium, iron, antagonism

Cd 是对所有生物都有害的重金属元素，极易在根系从土壤吸收的过程中与其他二价金属离子（如 Fe 和 Zn）竞争。Cd 还可以通过食物链在人体内富集，长期积累可导致骨质疏松症、癌症和肾功能障碍等多种疾病。随着工业化的快速发展以及化肥和农药的过度使用，土壤中不断增加的 Cd 污染已经严重威胁到粮食安全，增加了对人类健康的潜在风险，并造成了巨大的经济损失（Kirkham, 2006; Wei & Yang, 2010）。因此，研究植物吸收 Cd 的分子机理并筛选和培育耐 Cd 胁迫或低 Cd 累积的农作物，有益于人类健康和生态保护。

由于 Cd 和 Fe 具有相似的水合离子半径，Cd 极易通过与 Fe 竞争并借助 Fe 离子通道或转运蛋白进入植物体内（Nightingale, 1959; Eide et al., 1996; Schutzendubel & Polle, 2002; Clemens, 2006）。Cd 在植物体内的积累导致幼叶明显褪绿、坏死、生长受阻甚至死亡，这与典型的缺 Fe 症状相似（Das et al., 1997; Cohen et al., 1998; Yoshihara et al., 2006）。相关研究表明，Cd 胁迫改变了细胞壁成分，增强了细胞壁对 Fe 的结合能力，导致 Fe 滞留在根的质外体中，并抑制 Fe 从根部到地上部的转运（Xu et al., 2015），这些症状可以通过给植物补给

Fe 元素得到改善（Bao et al., 2010; He et al., 2017; Huang et al., 2020）。研究表明，Fe 转运体 IRT1（Iron-Regulated Transporter 1）参与 Cd 的吸收过程（Cohen et al., 1998; Korshunova et al., 1999; Vert et al., 2002; Fan et al., 2014; Mao et al., 2014; Guan et al., 2019; Zhu et al., 2020）。在拟南芥里，*IRT1* 的表达直接受转录因子 FIT（FER-like Iron deficient-induced Transcription factor）和 bHLH Ib 亚族成员（bHLH38、bHLH39、bHLH100 和 bHLH101）的调控（Yuan et al., 2008）。*FIT* 和 *bHLH38* 或 *bHLH39* 的共表达通过增加根部对 Cd 的螯合而减少地上部的 Cd 积累来提高植物对 Cd 胁迫的耐受性（Wu et al., 2012）。转录因子 bHLH104 正调控拟南芥 Fe 稳态，过表达 *bHLH104* 则可提高植物对 Cd 的耐受性（Zhang et al., 2015; Li et al., 2016; Yao et al., 2018）。BTS（BRUTUS）负调控 Fe 稳态，敲除 *BTS* 显著增强了拟南芥对 Cd 胁迫的耐受性，同时增加了 Fe 和 Cd 的积累（Kobayashi et al., 2013; Hindt et al., 2017; Zhu et al., 2020）。在水稻中，两个 Fe 转运蛋白 OsNRAMP1（Natural Resistance-Associated Macrophage Protein 1）和 OsIRT1 可以介导根系从土壤中吸收 Cd，且过表达 *OsNRAMP1* 和 *OsIRT1* 可以增加水稻的 Cd 含量（Lee & An, 2009; Takahashi et al., 2019）。由于 Fe 和 Cd 之间存在拮抗作用，水稻缺 Fe 会显著增加根系对 Cd 的吸收，而外源施加 Fe 则会降低水稻的 Cd 含量并减缓 Cd 毒害（Shao et al., 2007）。综上所述，改善 Fe 的积累和分配可以显著减轻 Cd 对植物的毒害。因此，全面了解 Fe 和 Cd 的拮抗作用有利于指导农业生产，降低 Cd 对植物的毒性。

小肽泛指小于 100 个氨基酸的蛋白质，具有短的氨基酸共有基序，参与植物生长发育和非生物等逆境的胁迫响应（Czyzewicz et al., 2013; Matsubayashi, 2014）。IMA（IRON MAN）多肽家族成员的碳末端包含一个 17 氨基酸的共有基序，在被子植物中高度保守，而且这 17 个氨基酸就足以代替其全长蛋白发挥作用（Grillet et al., 2018; Li et al., 2021）。近年来，小肽作为激素类信号分子受到广泛的关注，参与器官内通讯、植物发育和胁迫应答（Takahashi et al., 2019; Tavormina et al., 2015）。IMA 可能介导了 Fe 从地上部到根部的长距离信号，参与 Fe 的吸收、转运和细胞内稳态（Grillet et al., 2018; Li et al., 2021）。近来研究表明，过表达 IMA 可以提高在拟南芥中对 Cd 胁迫的适应性（Meng et al., 2022）。但是，目前关于 IMA 是否可以提高农作物对 Cd 胁迫的适应性还不清楚。该探究了水稻 *OsIMA1* 调控 Cd 胁迫方面的作用，以期为未来利用分子育种提高水稻对 Cd 胁迫的耐受性提供理论依据。

1.材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为粳稻品种“日本晴”，种植地点为云南省西双版纳傣族自治州勐腊县勐仑镇

中国科学院西双版纳热带植物园的作物保护与育种基地（101°19′ E；21°52′ N）。将水稻种子用双蒸水（ddH_2O）浸泡 24 h 后均匀地散布在吸水滤纸中，在 28℃人工温室黑暗放置 3 d 后，转移到 1/2 MS 培养液中萌发生长 7 d，然后转移至不含 Cd 或含 25 μM 氯化镉（$CdCl_2$）的 1/2 MS 水培液中培养 7 d。每 2 d 换 1 次水培液。生长光周期为光 16 h/暗 8 h 循环。

1.2 转基因植株的构建

利用 CRISPR-GE（http://skl.scau.edu.cn/）在线设计 *OsIMA1* 的编辑靶点。通过 Overlapping PCR 构建包含该靶点的 sgRNA，并融合至 *OsU6a* 启动子的下游，然后将 OsU6a-sgRNA 克隆至携带 Cas9 的 pMH-SA 载体（Liang et al., 2016）。将表达载体转化至农杆菌 EHA105 菌株中用于水稻转化，并对转基因阳性苗进行 PCR 测序。对纯合植株进行扩繁，并进一步对 T3 代植物在进行 PCR 测序，获得纯合突变植株。

用玉米 ubiquitin 启动子驱动 *OsIMA1* 全长 CDS，获得 *OsIMA1* 过表达载体。将构建的质粒转化至农杆菌 EHA105 菌株中用于水稻转化。选用含潮霉素抗性的转基因植株进行基因表达水平检测，T3 转基因植株用来试验分析。

1.3 qRT-PCR

用水饱和酚法提取水稻根（root）或地上部（shoot）的总 RNA。用 RT Primer Mix (oligo dT)和 PrimeScript RT Enzyme Mix for qPCR (宝生物，日本)试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA，随后使用 PrimeScript™RT 试剂(Perfect Real Time) Kit (宝生物，日本)在 Light-Cycler 480 实时 PCR 仪(罗氏，瑞士)上进行 qRT-PCR 检测。每个基因的定量至少含三次生物学重复。以 *OsACTIN1* 和 *OsOBP* 作为内参对照，对样品进行归一化处理。

1.4 Fe 和 Cd 含量测定

不同基因型的水稻材料于 1/2 MS 营养液体萌发生长 7 d 后转移至不含 Cd 或含 25 μM $CdCl_2$ 的 1/2 MS 水培液培养 7 d。分别收取根和叶，并置于 65℃烘箱干燥 7 d。用高通量组织研磨仪打磨样品成粉末。每个样品称取 500 mg，加入 5 mL 硝酸于 185℃中消解 3 h，然后加入 2 mL 高氯酸于 220℃氧化 30 min。利用美国 Thermo SCIENTIFIC 公司的电联耦合等离子体质谱仪（ICP-MS iCAP6300）测定样品元素含量。

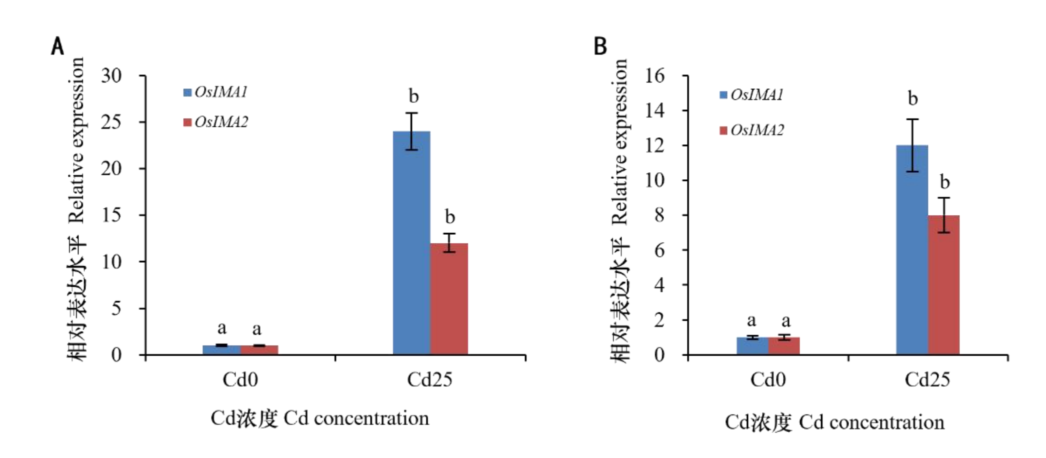
1.5 统计分析

所有的试验数据均使用平均值±标准差（Mean ± SD）表示。每个试验至少有 3 次生物学重复。利用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析(one-way variance, ANOVA) ($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 Cd 胁迫引起水稻 *OsIMA* 基因表达上调

水稻基因组包含两个 *OsIMA* 基因（*OsIMA1* 和 *OsIMA2*）。近来的研究表明 *OsIMA1* 和 *OsIMA2* 受到缺 Fe 诱导。Cd 胁迫会严重限制植物的生长发育，导致植物表现出缺 Fe 症状。为了研究 Cd 胁迫是否能影响 *OsIMA1* 和 *OsIMA2* 的表达，对野生型水稻进行 Cd 处理后，检测了 *OsIMA1* 和 *OsIMA2* 的表达情况。我们将在正常培养液上生长 7 d 的幼苗转移至不含 Cd 或含 25 μM $CdCl_2$ 的培养液中生长 7 d。然后提取根和地上部的 RNA 并利用荧光定量 PCR 检测 *OsIMA1* 和 *OsIMA2* 的表达水平。结果表明，在 Cd 胁迫条件下，无论在根还是地上部，*OsIMA1* 和 *OsIMA2* 的表达均显著上调（图 1）。



A.根；**B.** 地上部。在正常培养液上生长 7 d 的幼苗转移至无 Cd（Cd0）或含 25 μM $CdCl_2$（Cd25）的培养液中上生长 7 d，取根和地上部样品用于提取 RNA 并进行 qRT-PCR。图中数据是 3 次生物学重复试验的平均值±标准差（Mean ± SD）的结果，不同小写字母表示 *OsIMA* 在不同镉浓度处理下统计学上的显著差异（$P < 0.05$）。

A. Root; **B**. Shoot. The seedlings grown in normal solution for 7 d were transferred to the same solution without Cd (Cd0) or with 25 μM $CdCl_2$ (Cd25) for 7 d. Roots and shoots were sampled and used for RNA extraction and qRT-PCR. The data represent means ± standard deviation (SD) (n = 3). Different small letters above each bar indicate statistically significant differences between different Cd concentrations treatments under the same *OsIMA*, respectively (ANOVA, $P < 0.05$).

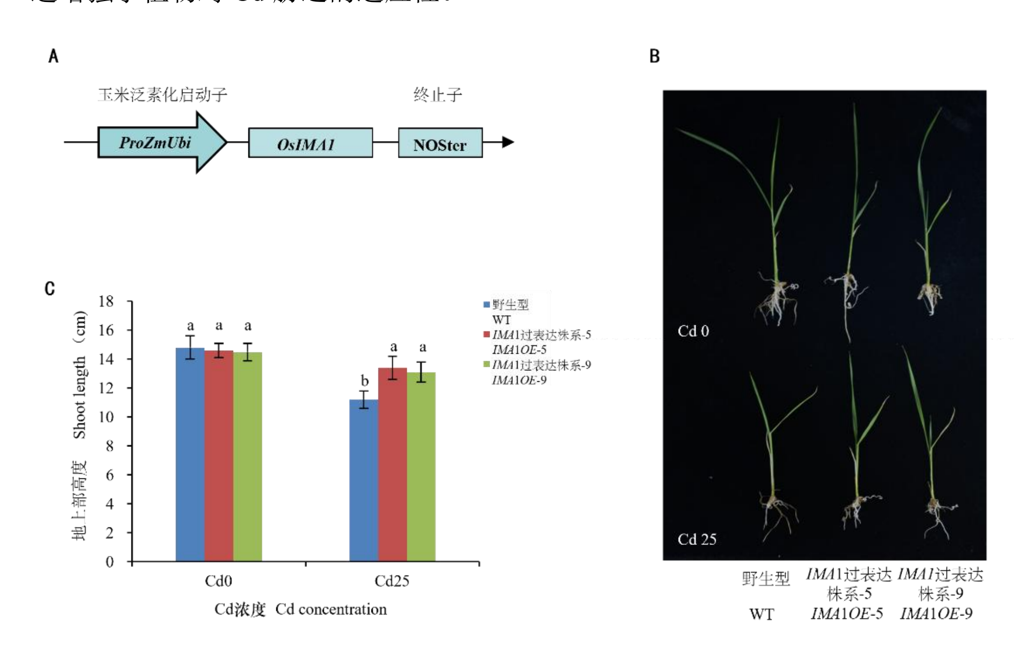
图 1 水稻 *OsIMA1* 和 *OsIMA2* 对 Cd 胁迫的响应

Fig. 1 Expression of *OsIMA1*and *OsIMA2* of rice in response to Cd exposure

2.2 *OsIMA1* 过表达植株对 Cd 耐受性更高

OsIMA1 和 *OsIMA2* 属于同源蛋白，且二者在 Fe 稳态方面的功能相近。考虑到二者的转

录水平都受到 Cd 处理诱导，本研究接下来以 *OsIMA1* 作为代表进行了研究。本研究利用玉米的 Ubiquitin 启动子驱动 *OsIMA1* 基因，并且转化了野生型水稻品种“日本晴”（图 2：A）。通过定量 PCR 筛选获得了 *OsIMA1* 的过表达转基因水稻植株。然后，本研究评估了 *OsIMA1* 过表达植株对 Cd 胁迫的适应能力。在正常水培溶液生长一周的幼苗分别被转移到不含 Cd（Cd0）或含 25 μM $CdCl_2$（Cd25）的溶液再生长一周，然后观察和分析其表型。结果表明，在 Cd0 生长条件下，*OsIMA1* 的过表达植株与野生型植株无明显区别，而在 Cd25 处理条件下，过表达植株的株高显著高于野生型植株（图 2：B 和 C）。这些结果表明，*OsIMA1* 过表达增强了植物对 Cd 胁迫的适应性。



A. 过表达载体示意图。**B.** 野生型和 *OsIMA1* 过表达的表型。在正常培养液上生长 7 d 的幼苗转移至不含或含 25 μM $CdCl_2$ 的营养液上生长 7 d。**C.** 野生型和 *ima1* 突变体的地上部高度。WT（wild-type，野生型）。不同小写字母表示不同植株同一镉浓度处理之间统计学上的显著差异（方差分析，$P < 0.05$）。下同。

A. Schematic diagram of *OsIMA1* overexpression vector. *Zea mays Ubiquitin* promoter was used to drive the expression of *OsIMA1*. The underlined three-base indicates the PAM region recognized by CRISPR/Cas9 system. *ima1-1* contains an insertion of ‘c’ and *ima1-2* contains an insertion of ‘t’. **B.** Phenotypes of wild-type (WT) and *IMA1OE* plants. Seedlings grown in normal solution for 7 d were transferred to the same solution without Cd (Cd0) or with 25 μM $CdCl_2$ (Cd25) for 7 d. **C.** Shoot height of wild-type (WT) and *IMA1OE* plants. The data represent means ± standard deviation (SD) (n = 3). Different letters above each bar indicate statistically significant differences between same Cd concentration treatment under different plants, respectively (ANOVA, $P < 0.05$). The same below.

图 2 *OsIMA1* 过表达水稻植株对 Cd 处理耐受性

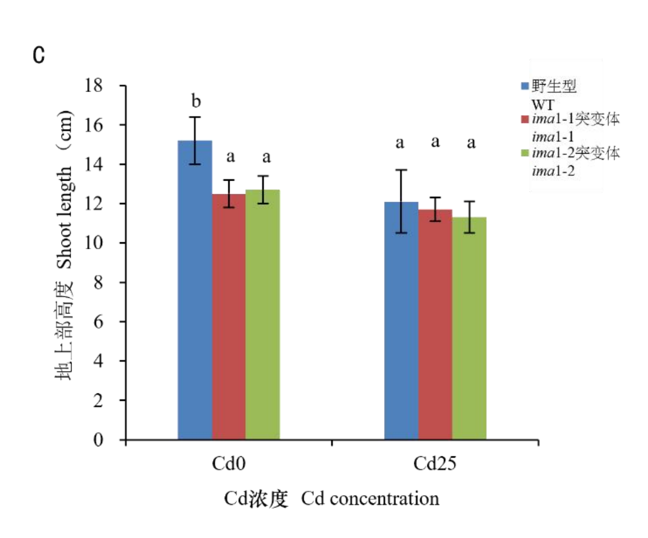
Fig. 2 Tolerance of *OsIMA1* overexpressing rice plants to Cd stress

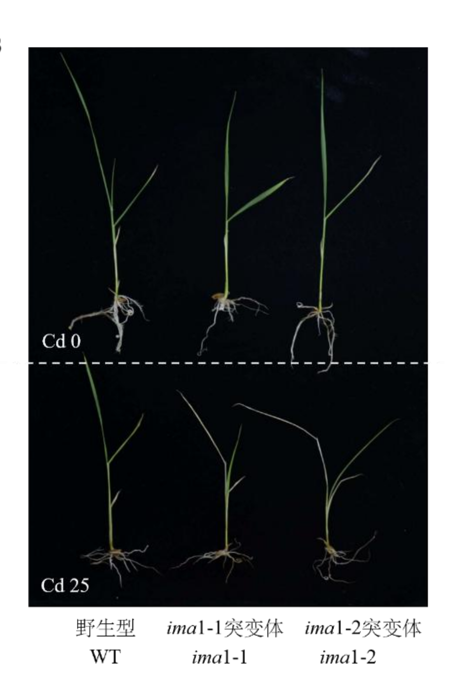
2.3 *OsIMA1* 的功能缺失突变体对 Cd 胁迫更敏感

为了进一步研究 *OsIMA1* 在适应 Cd 胁迫方面的作用，本研究利用 CRISPR-Cas9 基因编辑技术对 *OsIMA1* 基因进行了编辑，并获得了两个 *ima1* 突变体。本研究在 *OsIMA1* 基因的编码区设计了一个特异性的靶点，用 *OsUba* 启动子驱动整合了该靶点的 sgRNA，并构建了相应的表达载体。通过转化野生型水稻愈伤组织，获得了转基因植株。通过 PCR 鉴定及后代分离纯化，得到两个纯合的突变体株系 *ima1-1* 和 *ima1-2*。两个株系均因基因编码区插入一个碱基导致移码突变（图 3：A）。然后，本研究对野生型和两个功能缺失突变体的植株进行了 Cd 处理试验。结果表明，在正常水培液生长条件下，两个突变体株系与野生型植株无明显差别（图 3：B 和 C）。在 Cd 处理条件下，突变体植株表现出幼叶缺绿甚至萎蔫等症状(图 3：B)。这些结果表明 *OsIMA1* 功能缺失增加了植物对 Cd 的敏感性。

A

...GGTAGGATGGCCGAGACcAGACGG... *ima*1-1突变体 *ima*1-1
...GGTAGGATGGCCGAGACtAGACGG... *ima*1-2突变体 *ima*1-2
...GGTAGGATGGCCGAGAC-AGACGG... 野生型 WT





A. *ima1* 突变体的基因型。*OsU6a* 启动子用来驱动 sgRNA 的表达。下划线的三个碱基代表 CRISPR/Cas9 系统识别的 PAM 位点。*ima1-1* 包含一个碱基“c”插入，*ima1-2* 包含一个碱基“t”插入。WT（wild-type，野生型）。**B.** 野生型和 *ima1* 突变体的表型。**C.** 野生型和 *ima1* 突变体的地上部高度。

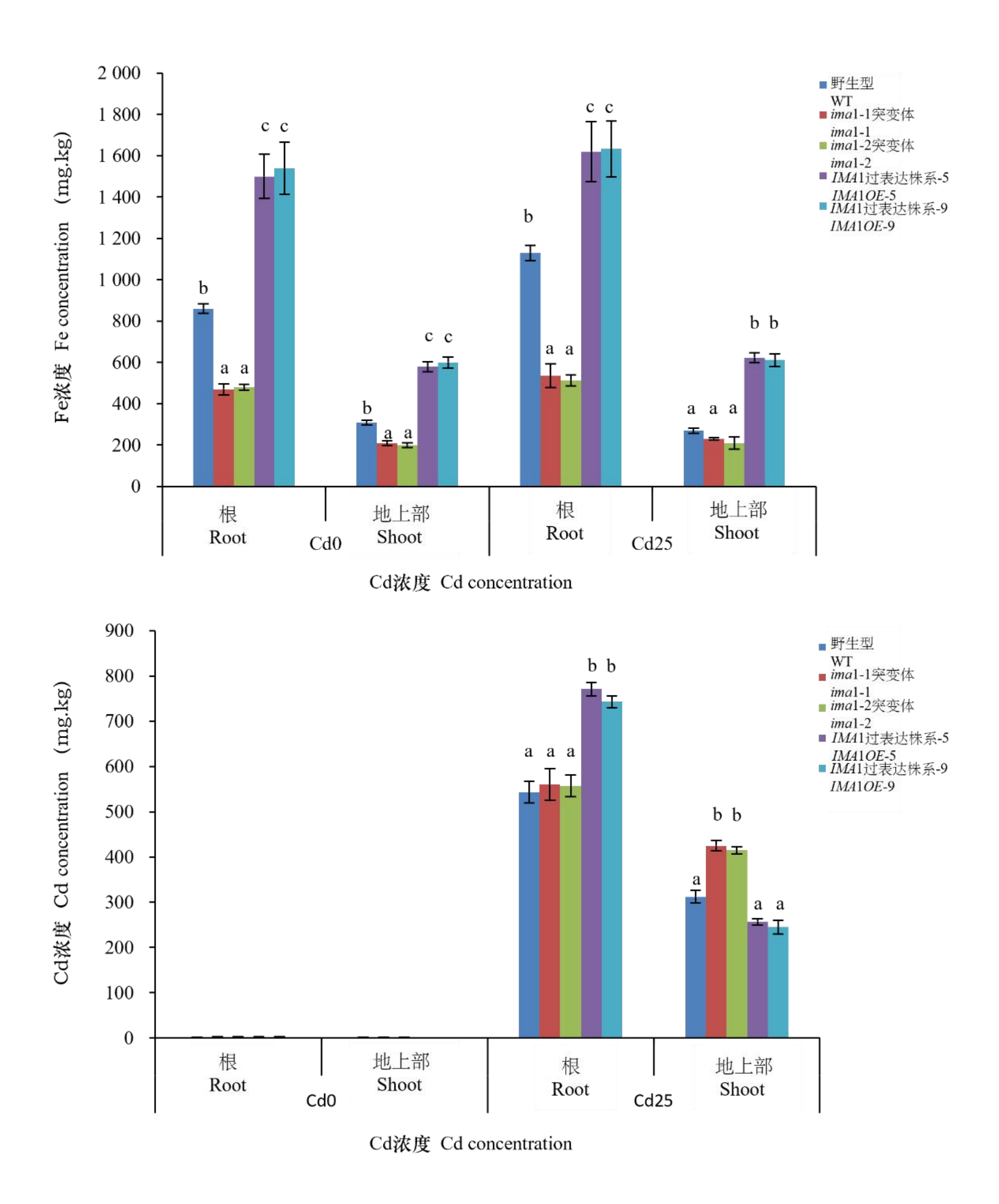
A. Genotypes of *ima1* mutants. *OsU6a* promoter was used to drive the expression of sgRNA. The underlined three-base indicates the PAM region recognized by CRISPR/Cas9 system. *ima1-1* contains an insertion of ‘c’ and *ima1-2* contains an insertion of ‘t’. **B.** Phenotypes of wild-type (WT) and *ima1* plants. **C.** Shoot height of wild-type (WT) and *ima1* plants.

图 3 *OsIMA1* 功能缺失突变体的表型

Fig. 3 Phenotypes of *ima1* loss-of-function mutants

2.4 *OsIMA1* 负调控 Cd 从根向叶的转运

本研究结果表明 *OsIMA1* 过表达植株比野生型更耐 Cd 胁迫，而 *ima1* 突变体则相反。为了进一步分析 *OsIMA1* 正调控 Cd 耐受的分子机制，本研究测定了野生型、*OsIMA1* 过表达株系和 *ima1* 突变体的根和叶片中的 Cd 和 Fe 含量。本研究将在正常培养液中生长 7 d 的幼苗分别转移到不含 Cd 或含有 25 μM $CdCl_2$ 的培养液中培养 7 d，然后分别取根和叶用来检测 Fe 和 Cd 的含量。Fe 浓度测定结果表明，与野生型相比，*OsIMA1* 过表达植株的根和地上部都积累了更多的 Fe，而 *ima1* 突变体则积累了较少的 Fe（图 4）。Cd 浓度测定结果表明，*OsIMA1* 过表达植物在根中积累了较多的 Cd，而 *ima1* 突变体在地上部积累了较多的 Cd（图 4）。这些结果表明 *OsIMA1* 负调控 Cd 从根向地上部的运输。



野生型（WT）、*ima1* 突变体以及 *OsIMA1* 过表达植株的 Fe 和 Cd 含量。图中数据是 3 次重复的均值±标准差的结果。不同小写字母表示统计学上的显著差异（方差分析，$P < 0.05$）。

Fe and Cd concentrations in WT(wild-type), *ima1* mutants and *OsIMA1* overexpressing plants. The data represent means ± standard deviation (SD) (n = 3). Different letters above each bar indicate statistically significant differences(ANOVA, $P < 0.05$).

图 4 水稻植株的 Fe 和 Cd 含量

Fig. 4 Fe and Cd concentrations in rice plants

3 讨论

Cd 对动植物的生长发育有害，近年来水稻受到 Cd 污染的事件频频发生。因此，减少植物的 Cd 吸收或提高植物对 Cd 胁迫的适应性，有利于保障粮食安全。Fe 是植物生长发育所必需的营养元素，而缺 Fe 是导致人类贫血症的一个主要原因。水稻作为主粮作物，是人类 Fe 元素的一个主要来源。因此，培育富 Fe 稻米有益于改善人类健康。由于 Fe 和 Cd 之间的拮抗作用，额外施加 Fe 可以减少植物对 Cd 的吸收（Wu et al. , 2012; Sebastian & Prasad, 2016）。因此利用 Fe 和 Cd 的拮抗机制可以提高植物对 Cd 胁迫的适应性。水稻中存在两个 *OsIMA* 基因：*OsIMA1* 和 *OsIMA2*，它们的过表达能激活缺 Fe 诱导基因的表达，从而增加 Fe 的累积（Kobayashi et al., 2021）。本研究发现，Cd 胁迫时 *OsIMA1* 和 *OsIMA2* 的表达显著上调（图 1）。Cd 处理试验发现 *OsIMA1* 的功能缺失突变体提高了水稻对 Cd 的敏感性，主要表现在植株叶片白化萎蔫（图 3）。而 *OsIMA1* 过表达一方面增加了 Fe 的积累，另一方面抑制了 Cd 从根向地上部的转运（图 4），这可能是 *OsIMA1* 过表达植株对 Cd 耐受性提高的原因。因此，增加 *OsIMA1* 的表达水平是缓解植物 Cd 毒害的一个有效策略。

最近的一项研究表明，*IMA* 过表达可以提高拟南芥对 Cd 胁迫的适应能力（Meng et al., 2022）。本研究发现 *OsIMA1* 过表达提高了水稻对 Cd 胁迫的耐受性（图 3）。水稻根摄入的 Fe 和 Cd 经地上部转运至稻米中。*OsIMA1* 过表达既促进了 Fe 在根部的累积，又促进了 Cd 在根部的积累。但是，*OsIMA1* 过表达促进了 Fe 在地上部积累的同时，也抑制了 Cd 从根向地上部的转运。这表明，*OsIMA1* 可以通过特异性地抑制 Cd 从根向地上部的转运，提高植物对镉胁迫的适应性。Fe 和 Cd 同属于二价离子，在体内可能被类似的转运蛋白识别。*OsIMA1* 过表达植株根部累积的 Fe 可能竞争抑制了 Cd 与这些转运蛋白的结合。*OsIMA1* 这种限制植物从根向地上部转运 Cd 的能力可能有助于减少稻米中的 Cd 累积。未来可以测试 *OsIMA* 过表达是否可减少稻米中的 Cd 含量。无论在拟南芥还是在水稻中，IMA 都具有增加 Fe 吸收，增强 Cd 耐受的生物学功能，这暗示 IMA 在不同物种中的功能保守。IMA 的高度保守性可能有助于打破基因功能物种特异性的限制（Grillet et al., 2018）。因此，未来的研究可以测试 IMA 是否可以提高其他作物的耐 Cd 能力。

已有研究表明，IMA 小肽碳末端的 17 个氨基酸就足以发挥其分子功能（Grillet et al., 2018; Li et al., 2021）。目前，人工合成小分子多肽的技术已经非常流行。因此，未来有望将 IMA 开发为一种商用多肽，通过施肥的方式提高植物对 Cd 耐胁迫的适应性。综上所述，IMA 可作为减轻植物 Cd 毒害的一个潜在可利用的小分子。进一步研究 IMA 调控 Cd 胁迫的机制，

将为基因工程技术改造植物或培育耐 Cd 胁迫的农作物提供理论依据。

参考文献：

BAO T, SUN LN, SUN TH, 2010. Evaluation of iron on cadmium uptake by tomato, morel and leaf red beet in hydroponic culture[J]. J Plant Nutr, 33(5): 713-723.

CLEMENS S, 2006. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants[J]. Biochimie, 88(11): 1707-1719.

COHEN C K, FOX T C, GARVIN D F, et al., 1998. The role of iron-deficiency stress responses in stimulating heavy-metal transport in plants[J]. Plant Physiol, 116(3): 1063-1072.

CZYZEWICZ N, YUE K, BEECKMAN T, et al., 2013. Message in a bottle: small signalling peptide outputs during growth and development[J]. J Exp Bot, 64(17): 5281-5296.

DAS P, SAMANTARAY S, ROUT GR, 1997. Studies on cadmium toxicity in plants: a review[J]. Environ Pollut, 98(1): 29-36.

EIDE D, BRODERIUS M, FETT J, et al., 1996. A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 93(11): 5624-5628.

FAN SK, FANG XZ, GUAN MY, et al., 2014. Exogenous abscisic acid application decreases cadmium accumulation in *Arabidopsis* plants, which is associated with the inhibition of IRT1-mediated cadmium uptake[J]. Front Plant Sci, 5(1): 721.

GRILLET L, LAN P, LI W, et al., 2018. IRON MAN is a ubiquitous family of peptides that control iron transport in plants[J]. Nat Plants, 4(11): 953-963.

GUAN MY, ZHU YX, LIU XX, et al., 2019. Induction of S-nitrosoglutathione reductase reduces root cadmium uptake by inhibiting Iron-regulated transporter 1[J]. Plant Soil, 438(1): 251-262.

HE XL, FAN SK, ZHU J, et al., 2017. Iron supply prevents Cd uptake in *Arabidopsis* by inhibiting IRT1 expression and favoring competition between Fe and Cd uptake[J]. Plant Soil, 416(1): 453-462.

HINDT MN, AKMAKJIAN GZ, PIVARSKI KL, et al., 2017. BRUTUS and its paralogs, BTS LIKE1 and BTS LIKE2, encode important negative regulators of the iron deficiency response in *Arabidopsis thaliana*[J]. Metallomics, 9(7): 876-890.

HUANG G, DING C, LI Y, et al., 2020. Selenium enhances iron plaque formation by elevating the

radial oxygen loss of roots to reduce cadmium accumulation in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. J Hazard Mat, 398(1): 122860.

KIRKHAM MB, 2006. Cadmium in plants on polluted soils: effects of soil factors, hyperaccumulation, and amendments[J]. Geoderma, 137(1): 19-32.

KOBAYASHI T, NAGANO AJ, NISHIZAWA NK, 2021. Iron deficiency-inducible peptide codin genes OsIMA1 and OsIMA2 positively regulate a major pathway of iron uptake and translocation in rice[J]. J Exp Bot , 72(6): 2196-2211.

KOBAYASHI T, NAGASAKA S, SENOURA T, et al., 2013. Iron-binding haemerythrin RING ubiquitin ligases regulate plant iron responses and accumulation[J]. Nat Commun, 4(1): 2792.

KORSHUNOVA YO, EIDE D, CLARK WG, et al., 1999. The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range[J]. Plant Mol Biol, 40(1): 37-44.

LEE S, AN G, 2009. Over-expression of OsIRT1 leads to increased iron and zinc accumulations in rice[J]. Plant Cell Environ, 32(4): 408-416.

LI J, LIU JC, YAN CL, et al., 2019. The alleviation effect of iron on cadmium phytotoxicity in mangrove A. marina. Alleviation effect of iron on cadmium phytotoxicity in mangrove *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh[J]. Chemosphere, 226(1): 413-420.

LI X, ZHANG H, AI Q, et al., 2016. Two bHLH transcription factors, bHLH34 and bHLH104, regulate iron homeostasis in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Physiol, 170(4): 2478-2493.

LI Y, LU CK, LI CY, et al., 2021. IRON MAN interacts with BRUTUS to maintain iron homeostasis in *Arabidopsis*[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 118(39): e2109063118.

LIANG G, ZHANG H, LOU D, et al., 2016. Selection of highly efficient sgRNAs for CRISPR/Cas9 - based plant genome editing[J]. Sci Rep, 6(1): 21451.

MAO QQ, GUAN MY, LU KX, et al., 2014. Inhibition of nitrate transporter 1.1-controlled nitrate uptake reduces cadmium uptake in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiol, 166(2): 934-U730.

MATSUBAYASHI Y, 2014. Posttranslationally modified small-peptide signals in plants[J]. Annu Rev Plant Biol, 65(1): 385-413.

MENG X, LI W, SHEN R, et al., 2022. Ectopic expression of IMA small peptide genes confers tolerance to cadmium stress in *Arabidopsis* through activating the iron deficiency response[J]. J Hazard Mat, 422(1): 126913.

NIGHTINGALE ER, 1959. Phenomenological theory of ion solvation-effective radii of hydrated

ions[J]. J Phys Chem, 63(9): 1381-1387.

SCHUTZENDUBEL A, POLLE A, 2002. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal induced oxidative stress and protection by mycorrhization[J]. J Exp Bot, 53(372): 1351-1365.

SEBASTIAN A, PRASAD MN, 2016. Iron plaque decreases cadmium accumulation in *Oryza sativa* L. and serves as a source of iron[J]. Plant Biol, 18(6): 1008-1015.

SHAO G, CHEN M, WANG W, et al., 2007. Iron nutrition affects cadmium accumulation and toxicity in rice plants[J]. Plant Growth Regul, 53(1): 33-42.

TAKAHASHI F, HANADA K, KONDO T, et al., 2019. Hormone-like peptides and small coding genes in plant stress signaling and development[J]. Curr Opin Plant Biol, 51(1): 88-95.

TAKAHASHI R, ISHIMARU Y, SENOURA T, et al., 2011. The OsNRAMP1 iron transporter is involved in Cd accumulation in rice[J]. J Exp Bot, 62(14): 4843-4850.

TAVORMINA P, DE CONINCK B, NIKONOROVA N, et al., 2015. The plant peptidome: an expanding repertoire of structural features and biological functions[J]. Plant Cell, 27(8): 2095-2118.

VERT G, GROTZ N, Dedaldechamp F, et al., 2002. IRT1, an Arabidopsis transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth[J]. Plant Cell, 14(6): 1223-1233.

WEI B, Yang L, 2010. A review of heavy metal contaminations in urban soils, urban road dusts and agricultural soils from China[J]. Microchem J, 94(2): 99-107.

WU H, CHEN C, DU J, et al., 2012. Co-overexpression FIT with AtbHLH38 or AtbHLH39 in *Arabidopsis*-enhanced cadmium tolerance via increased cadmium sequestration in roots and improved iron homeostasis of shoots[J]. Plant Physiol, 158(2): 790-800.

XU SS, LIN SZ, LAI ZX, 2015. Cadmium impairs iron homeostasis in *Arabidopsis thaliana* by increasing the polysaccharide contents and the iron-binding capacity of root cell walls[J]. Plant Soil, 392(1): 71-85.

YAO X, CAI Y, YU D, et al., 2018. bHLH104 confers tolerance to cadmium stress in *Arabidopsis thaliana*[J]. J Integr Plant Biol, 60(8): 691-702.

YOSHIHARA T, HODOSHIMA H, MIYANO Y, et al., 2006. Cadmium inducible Fe deficiency responses observed from macro and molecular views in tobacco plants[J]. Plant Cell Rep, 25(4): 365-373.

YUAN Y, WU H, WANG N, et al., 2008. FIT interacts with AtbHLH38 and AtbHLH39 in

regulating iron uptake gene expression for iron homeostasis in *Arabidopsis*[J]. Cell Res, 18(3): 385-397.

ZHANG J, LIU B, LI M, et al., 2015. The bHLH transcription factor bHLH104 interacts with IAA-LEUCINE RESISTANT3 and modulates iron homeostasis in *Arabidopsis*[J]. Plant Cell, 27(3): 787-805.

ZHU YX, DU WX, FANG XZ, et al., 2020. Knockdown of BTS may provide a new strategy to improve cadmium-phytoremediation efficiency by improving iron status in plants[J]. J Hazard Mat, 384(1): 121473.